Thesis Title Development of Anti-wrinkle Cosmetic Formulations Containing Extracts from Leaves of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.)

Author Ms. Kulthida Kumguan

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee
Prof. Dr. Aranya Manosroi — Advisor
Prof. Dr. Jiradej Manosroi — Co-advisor
Dr. Tanachai Pankasemsuk — Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to develop an anti-wrinkle cosmetic formulation containing extract from leaves of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.). Leaves of Long Kong which collected from Chantaburi in Thailand were extracted by the hot and cold processes using three different solvents including water, chloroform and methanol. The crude extracts were tested for antioxidative activities, tyrosinase inhibition and *in vitro* cytotoxicity as well as the MMP-2 inhibition activity on human skin fibroblasts for anti-aging evaluation. The hot water crude extract showed the highest antioxidative activities (DPPH radical scavenging, metal ion chelating and lipid peroxidation inhibition) with the SC_{50}, CC_{50} and IPC_{50} values of 5.40±1.23, 32.31±0.84 and 3.29±0.30 mg/ml, respectively, and the highest tyrosinase inhibition activity with the IC_{50} value of 0.49±0.23 mg/ml. The extract also showed no cytotoxicity on human skin fibroblasts (cell viability of 80.52±15.16%). It demonstrated the anti-aging potential by having the pro and active MMP-2 inhibition activity, but lower than ascorbic acid of 1.28 and 1.12 times, respectively. The total phenolic and flavonoid contents containing in the hot water crude extract were 55.37 ± 0.10 µg GAE/g dry extract and 403.10 ± 0.03 µg QAE/g dry extract, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The semi-purified extracts were prepared from this crude extract by solvent-solvent partition. The ethyl acetate soluble fraction showed higher activities (DPPH radical scavenging, metal ion chelating and tyrosinase inhibition) than the crude extract of 23.48, 71.80 and 2.58 times, respectively. This fraction exhibited similar pro and active MMP-2 inhibitory effect to the crude extract. The phenolic and flavonoid contents of this semi-purified extract were 868.90±0.02µg GAE/g dry extract and 422.39±0.01 µg QE/g dry extract, respectively. The HPLC fingerprint profile of the ethyl acetate semi-purified extract gave the percentage of gallic acid content of 6.16%. The ethyl acetate semi-purified extract was decolorized by the liquid-liquid partition in order to eliminate the dark green color. The discolored water fraction exhibited *in vitro* anti-aging activities including DPPH radical scavenging activity (SC_{50} values of 0.09±0.04 mg/ml), lipid peroxidation inhibition (IPC_{50} value of 26.46±6.24 mg/ml) and metal ion chelating activity (0.28±0.17 mg/ml). This fraction also showed tyrosinase inhibition (IC_{50} value of 0.11±0.05 mg/ml) and gave no cytotoxicity on human skin fibroblast with the cell viability of 126.29 ± 0.81%. The discolored water fraction at 1 mg/ml exhibited gelatinolytic activity on MMP-2 inhibition on human skin fibroblast with the percentages of pro and active MMP-2 inhibition of 15.39±10.30 and 62.99±14.35%, respectively. The HPLC fingerprint of the discolored water fraction showed the peak of gallic acid with the percentages of 0.39%. The total phenolic and flavonoid contents of the discolored water fraction were 750.12±0.12 µg GAE/g extract 515.30 ± 0.64 µg QE/g extract, respectively. The ethyl acetate semi-purified extract at 0.1, 0.3 and 0.5% demonstrated no irritation on the rabbit skin by Draize test, but the discolored water fraction exhibited slightly irritation on the rabbit skin at 0.3 and 0.5%. After tested for the physical stability by the heating-cooling cycles for 12 days, gel No.1, serum No.1 and cream No.1 showed good physical stability. After kept at various temperatures (4±2, 27±2 and 45±2ºC) for 3 months, the cream containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1 and 0.5% exhibited good physical stability at all temperatures for 3 months. The shelf lives of the gallic acid in the cream containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1 and 0.5% were 0.37 and 0.30 days at 27±2ºC, 0.19 and 0.766 days at 4±2ºC, 0.54 and 0.54 days at 45±2ºC, respectively. The half lives of the gallic acid in the cream

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1, and 0.5% were 1.87 and 2.74 days at 27±2ºC, 1.28 and 3.78 days at 4±2ºC, 2.86 and 2.86 days at 45±2ºC, respectively. The cream formulations containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1, 0.3 and 0.5% showed no irritation on the rabbit skin by the Draize test with the PIIs value in the range of 0.0–0.2. The cream formulations at 0.1, 0.3 and 0.5% exhibited significant ($p<0.05$, Student's paired T-test) decreased skin elastic extension with the parameter changes of -35.79, -43.22 and -44.71%, respectively, and the cream formulations at 0.3 and 0.5% showed significant increased skin elastic recovery with %parameter changes of +15.46 and +23.55%, respectively. The cream containing the semi-purified extract at 0.1, 0.3 and 0.5% after 4 weeks of application exhibited significant decrease of the skin roughness in comparing to before application ($p<0.05$, Student's paired T-test) with the parameter change of -16.19, -18.73 and -24.82%, respectively. The cream containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.5% exhibited significantly the increased skin hydration with the %parameter changes of 42.41%. The skin erythema index of all developed formulations performed after 1, 2, 3 and 4 weeks of application revealed not significant differences ($p>0.05$, Student's paired T-test) in comparing to before application and the untreated area ($p>0.05$, One-way ANOVA). The cream formulations containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.5% after 4 weeks of application showed significant the decreased skin melanin in comparing to before application with the %parameter change of 34.45%. The satisfaction scale of the cream formulations containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1, 0.3 and 0.5% gave the average score of 3.93 (78.50%), 3.93 (78.56%) and 3.70 (73.94%), respectively. This indicated that most volunteers were satisfied with the physical appearance of all developed cream formulations. The results from this study have indicated the potential of the ethyl acetate fraction of the hot water crude extract from leaves of Long Kong to be developed as an anti-aging product.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางต้านริ้วรอยที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบลองกอง

ผู้เขียน นางสาว กุลธิดา คำกวน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. ธนะชัย พันธ์เกษมสุข	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับเครื่องสำอางต้านริ้วรอยที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) ได้นำตัวอย่างใบลองกองจากจังหวัดจันทบุรีมาสกัดด้วยวิธีร้อนและเย็นโดยใช้น้ำ คลอโรฟอร์ม และเมธานอลเป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธีจับอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) วิธีจับโลหะ (metal ion chelating activity) และวิธียับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation inhibition activity) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมตาโลโปรตีนเนส-2 (MMP-2) สารสกัดจากใบลองกองที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์สูงสุดในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีจับอนุมูลอิสระ จับโลหะ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันสูง (SC_{50}, CC_{50} and IPC_{50} เท่ากับ 5.40±1.23, 32.31±0.84 และ 3.29±0.30 มก./มล. ตามลำดับ) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} เท่ากับ 0.49±0.23 มก./มล.) สารสกัดนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 80.52±15.16%) สารสกัดจากใบลองกองที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 (เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง pro และ active MMP-2 เท่ากับ 72.96±13.44 และ 85.77±13.77% ตามลำดับ) สารสกัดจากใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลองกองที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 55.37±0.10 µg GAE/น้ำหนักแห้ง (ก.) และ 403.10±0.03 µg QAE/น้ำหนักแห้ง (ก.) ตามลำดับ เมื่อนำไปแยกสกัดด้วยวิธีวัฏภาคของเหลว (liquid-liquid extraction) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบลองกองที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีจับอนุมูลอิสระ จับโลหะ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน มีค่า SC_{50}, CC_{50} และ IPC_{50} เท่ากับ 0.23±0.02, 0.45±0.02 และ 33.48±14.49 มก./มล. ตามลำดับ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19±0.16 มก./มล. สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 95.94±0.55%) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ให้ฤทธิ์ยับยั้ง pro และ active MMP-2 เท่ากับ 60.23±7.89 และ 52.37±8.67% ตามลำดับ โครมาโทแกรมของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ประกอบด้วย gallic acid 6.16% สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 868.90±0.02µg GAE/น้ำหนักแห้ง (ก.) and 422.39±0.01 µg QE/น้ำหนักแห้ง (ก.) เมื่อขจัดสีออกจากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตด้วยวิธีวัฏภาคของเหลว สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ขจัดสีชั้นน้ำให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีจับอนุมูลอิสระ จับโลหะ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันสูง โดยมีค่า SC_{50}, CC_{50} และ IPC_{50} เท่ากับ 0.09±0.04, 0.28±0.17 และ 26.46±6.24 มก./มล. ตามลำดับ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} เท่ากับ 0.11±0.05 มก./มล.) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ขจัดสีชั้นน้ำที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 126.29±0.81% และให้ฤทธิ์ยับยั้ง pro และ active MMP-2 เท่ากับ 15.39±10.30 และ 62.99±14.35% ตามลำดับ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ขจัดสีชั้นน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 750.12±0.12 µg GAE/น้ำหนักแห้ง (ก.) และ 515.30±0.64 µg QE/น้ำหนักแห้ง (ก.) โครมาโทแกรมของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ขจัดสีชั้นน้ำมีปริมาณ gallic acid 0.39% สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.05% ไม่ก่อความระคายเคืองต่อผิวกระต่ายแต่สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ขจัดสีชั้นน้ำที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5% ก่อความระคายเคืองเล็กน้อยต่อผิวกระต่าย เมื่อทดสอบความคงตัวของตำรับเครื่องสำอางพื้นโดยวิธี heating-cooling cycle เป็นเวลา 12 วันแล้วได้เลือกครีม เจล และซีรั่มอย่างละ 1 สูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพสูงสุด โดยผสมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบลองกองที่แยกสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยเอธิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4±2, 27±2 และ 45±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ตำรับเครื่องสำอางทุกตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ครีมที่ผสมสารสกัดจากใบลองกองที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% มีอายุบนชั้น (shelf life) เท่ากับ 0.37 และ 0.30 วัน (27±2 องศาเซลเซียส), 0.19 และ 0.76 วัน (4±2 องศาเซลเซียส) และ 0.54 และ 0.54 วัน (45±2 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 1.87 และ 2.74 วัน (27±2 องศาเซลเซียส), 1.28 และ 3.78 วัน (4±2 องศาเซลเซียส), 2.86 และ 2.86 วัน (45±2 องศาเซลเซียส) ครีมที่ผสมสารสกัดจากใบลองกองที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% ไม่ก่อความระคายเคืองบนผิวกระต่าย (ค่า PIIs เท่ากับ 0.0 – 0.2) หลังจากทาผลิตภัณฑ์ 4 สัปดาห์ ครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% ช่วยลดความสามารถในการยืดตัวออกของผิว (skin elastic extension) เท่ากับ -35.79, -43.22 และ -44.71%, และครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5% ช่วยเพิ่มความสามารถในการคืนสภาพของผิว (skin elastic recovery) เท่ากับ +15.46 และ +23.55% ตามลำดับ ครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% ยังช่วยลดริ้วรอยบนผิว (skin roughness) เท่ากับ -16.19, -18.73 และ -24.82% ตามลำดับ ครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5% ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวเท่ากับ 42.41% ครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองบนผิวอาสาสมัคร และครีมที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5% ช่วยลดเม็ดสีเมลานินเท่ากับ 34.45% ระดับความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์ครีมที่ผสมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบลองกองที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% มีระดับคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3.93 (78.50%), 3.93 (78.56%) และ 3.70 (73.94%) ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่มีความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ครีมทั้งสามตัวอย่าง ดังนั้นในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของครีมที่ผสมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากใบลองกองที่แยกสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตในการลดริ้วรอยเหี่ยวย่นในอาสาสมัครได้ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved